



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura e do AbastecimentoRua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP
Telefone: (16) 274 2477 - Fax: (16) 272 5958 - e-mail: postmaster@cnpdia.embrapa.br

ISSN 1413-8808

PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 31, set/99, p.1-6

CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES NOS CORPOS PROTEÍCOS DO MILHO POR RMN.

Lucimara Aparecida Forato¹
Luiz Alberto Colnago^{1,2}
Richard Garrat³
Maurício Antonio Lope⁴

Introdução

É bem-conhecida a deficiência nutricional das proteínas do grão de milho por seu baixo teor de triptofano e lisina (Lastity, 1996). Como o milho é uma das principais fontes protéicas da dieta humana e animal, há grande interesse em melhorar sua qualidade protéica. As proteínas de reserva (zeínas) representam de 75 a 80% das proteínas deste cereal e por isso as técnicas usadas para melhorar a qualidade protéica estão relacionadas com a sua redução nos grãos ou à modificação do conteúdo de seus aminoácidos.

A zeínas são polipeptídeos de massa molecular de 10 a 28 KDa. São classificadas em zeínas, peptídeos com massa molecular de 19 KDa (Z19) e 22 KDa (Z22), insolúveis em água e solúveis em álcool hidratado e representam de 75-85% da fração de zeínas totais. As zeínas β , Z14 e Z16 são solúveis em álcool hidratado após uso de agentes redutores e representam de 10 a 15%. As zeínas γ , Z28 são solúveis em álcool e água após redução de pontes de dissulfeto (5-10%) e a zeína δ (Z10), que somente é encontrada em baixa quantidade. As zeínas são codificadas por uma família multigênica, o que leva a um elevado número de isoformas (Shewry et al, 1990).

Até o momento não há análise da estrutura de qualquer zeína por métodos de alta resolução, como difração de raios X ou RMN multidimensional em solução. A estrutura da zeína α tem sido estudada por vários métodos físico-químicos de baixa resolução que dão informações sobre a forma e dimensões das proteínas e conteúdo de estrutura secundária (Shewry et al, 1990)

¹Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

²Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, Cx Postal 741, CEP 13560-970.

³Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

⁴Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

PA/31, CNPDIA, set/99, p.2

As zeínas são sintetizadas por polirribossomas ligados à membranas e são transportados ao lúmen do retículo endoplasmático, onde são armazenadas em corpos protéicos, que são estruturas esféricas com cerca de 1 μm de diâmetro (Lending & Larkins, 1989). As zeínas são depositadas de 10 a 40 dias após a polinização. Estudos com imunolocalização demonstraram que as β e γ zeínas são sintetizadas primeiro e depois as α zeínas. Também indicaram que as β e γ zeínas ficam principalmente na parte externa do corpo protéico, enquanto a α zeína fica na parte central. As análises de corpos protéicos de mutantes como floury 2, com baixo teor de zeína α , indicaram que os corpos têm estrutura irregular e as zeínas estão desorganizadas dentro dessas organelas (Lending & Larkins, 1989, Larkins et al, 1993). Os estudos da deposição das zeínas também tem sido feita com zeínas modificadas, expressão zeínas em plantas de transgênicas e em microorganismos.

Neste comunicado apresentamos evidências de que os corpos protéicos do milho contém ácidos graxos livres. Isso tem grande implicações tanto nos trabalhos que visam a melhorar a qualidade protéica do milho como no estudo da estrutura tridimensionais das zeínas.

Materiais e Métodos

A extração dos corpos protéicos do milho foi realizada pelo procedimento de centrifugação em gradientes de sacarose.

As análises por RMN foram realizadas em um espectrômetro Varian Inova 400, com ímã supercondutor de 9,4 T, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária - São Carlos - SP. Os espectros de ^{13}C em estado sólido foram realizados com a técnica de polarização cruzada, rotação da amostra no ângulo mágico e desacoplamento de alta potência, conhecida como CPMAS.

Usou-se também a RMN de ^1H e ^{13}C com probe de análise em solução (líquido) para observar a presença dos ácidos graxos dentro dos corpos protéicos.

As análises cromatográficas e de espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo, HP 5890, acoplado a um detector seletivo de massa HP- 5970, pertencente ao Instituto de Química de São Carlos - SP.

Resultados e Discussões

Nas figuras 1A e 1B estão os espectros de RMN de ^{13}C em alta resolução no estado sólido (CPMAS) das zeínas α e de corpos protéicos de milho purificados após 21 dias de polinização, respectivamente. Esses espectros são típicos de proteínas em estado sólido, com o sinal em 172ppm relativo às carboxilas dos grupos peptídicos e das cadeias laterais; os sinais entre 100 e 140ppm dos resíduos aromáticos; os sinais entre 45 e 70ppm dos carbonos α e os sinais das cadeias laterais alifáticas entre 15 e 45ppm. Como o espectro do corpos protéicos (1B) é similar ao das zeínas α (1A), isso indica que o processo de purificação elimina completamente o amido, que tem o maior sinal em 75 ppm. A única diferença marcante entre esses dois espectros é a intensidade do sinal em 29ppm. Essa diferença pode ser explicada pela presença de outras substâncias nos corpos protéicos, além das zeínas, como os fosfolipídeos da sua membrana de cobertura. O deslocamento químico do sinal em 29ppm pode ser facilmente atribuído aos ácidos graxos dos fosfolipídeos que envolvem os corpos protéicos, no entanto a sua intensidade é muito elevada para ser atribuída apenas

PA/31, CNPDIA, set/99, p.3

a esses componentes, que estão em baixa concentração. A membrana tem apenas alguns nanômetros de espessura para uma esfera de aproximadamente 1m de diâmetro.

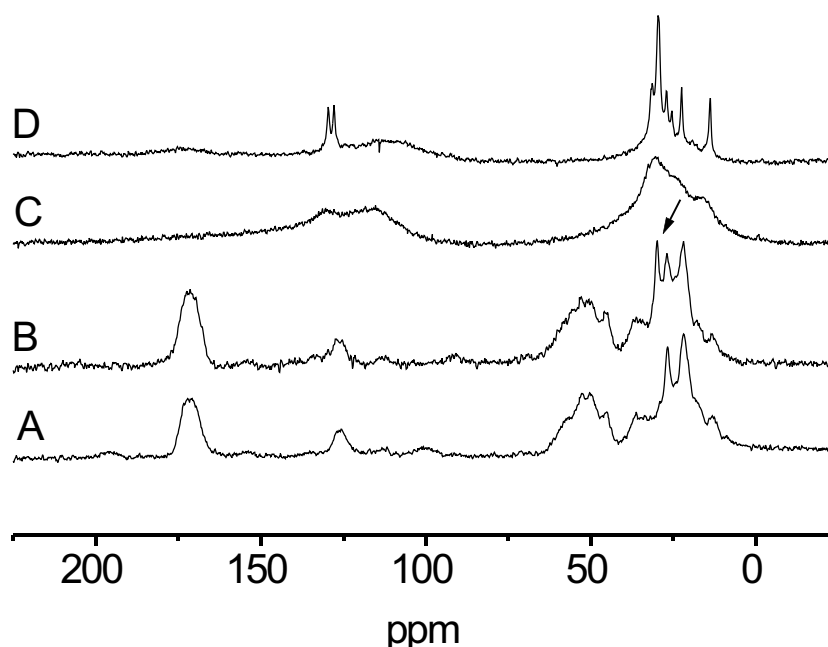


Figura 1: Espectros de RMN de ^{13}C dos corpos protéicos do milho e zeínas. A) Espectro de alta resolução em estado sólido (CPMAS) da zeína α . B) Espectro de alta resolução em estado sólido (CPMAS) de corpos protéicos de milho com 21 dias após polinização. C) Espectro dos mesmos corpos protéicos de B, com técnica de 1 pulso, sem CPMAS e D) Espectro nas mesmas condições de C, com alta rotação em torno do ângulo mágico.

Para identificar esses componentes fez-se o espectro de RMN de ^{13}C dos mesmos corpos protéicos, usando técnica de um pulso com e sem alta rotação no ângulo mágico (figuras 1C e 1D). Nestes experimentos com a aplicação de apenas um pulso observam-se os sinais dos materiais que têm T_1 curto, o que normalmente é devido às substâncias que estão em alta a mobilidade como triglicerídeos. Como se pode ver sem ângulo mágico as linhas são largas demonstrando que essas substâncias estão relativamente imobilizadas. Com o ângulo mágico, que tem a função de aumentar a resolução espectral e facilitar a análise, pode-se ver um sinal intenso em 29ppm, na mesma posição observada no espectro com polarização cruzada dos corpos protéicos (1B). Esses espectro é similar ao observado em proteínas de reserva de trigo (Tatham et al, 1990) e mileto (Sainani et al, 1992), nestas mesmas condições. O sinal largo na região de 172ppm é certamente das carboxilas da cadeia lateral das glutaminas (35% dos aminoácidos) e da carbonila de lipídeos. Os sinais em 130 e 128ppm podem ser devidos às cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos, mas estão exatamente na posição dos sinais dos carbonos insaturados dos ácidos graxos, linoléico/oléico. O sinal largo em 115ppm é do rotor. Os sinais abaixo de 45ppm são dos grupos metilenos dos ácidos graxos e da metila terminal em 14ppm. Neste espectro não foram observados sinais em 62 e 69ppm, que são relativos ao glicerol, indicando que não devem ser triglicerídeos ou fosfolipídeos.

PA/31, CNPDIA, set/99, p.4

Na figura 2A está o espectro de RMN de ^1H dos corpos protéicos, usando a sonda para solução. Com essa técnica tem sido possível obter espectros de triglicerídeos em sementes intactas ou oleossomas com resolução suficiente para identificar os hidrogênios ligados à dupla ligação, do glicerol e dos grupos metileno e à metila terminal (Rutar, 1989, Colnago & Seidl, 1983). Como se pode observar nesta figura o sinal é extremamente largo sem qualquer resolução. Com uma largura de linha em meia altura de 3KHz, indicando que não está com alta mobilidade como triglicerídeos em oleossomas e com comportamento similar ao espectro da figura 1C.

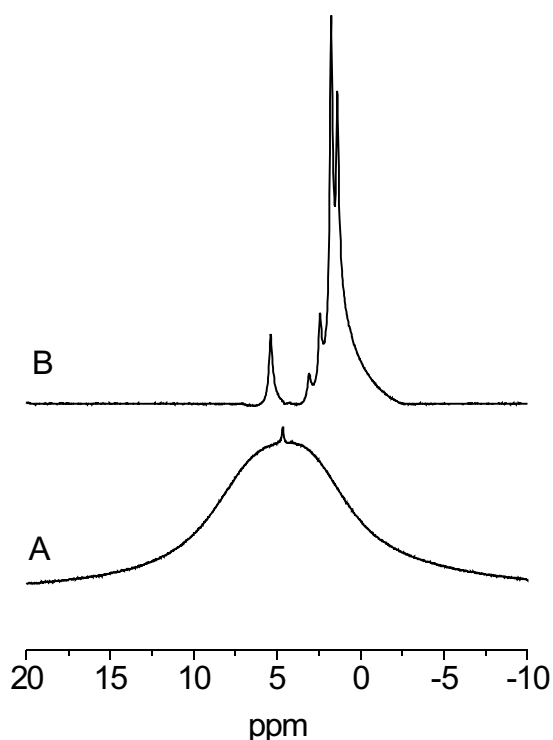


Figura 2: Espectros de RMN de ^1H de corpos protéicos de milho. A) Espectro obtido usando o probe para líquidos e água deuterada como "lock". O sinal estreito e de baixa intensidade em cima do sinal largo é da água não completamente deuterada. B) Espectro obtido com o probe de sólido (alta rotação em ângulo mágico) e com a técnica de pulso. O sinal largo em torno de 4,7ppm é de água presente nos corpos protéicos. Esse sinal desaparece com a liofilização da amostra.

Na figura 2B está o espectro de RMN de ^1H dos corpos protéicos usando a técnica de ângulo mágico, que serve para reduzir as larguras de linha espectrais e susceptibilidades magnéticas. Neste espectro pode-se observar o sinal em 5,3ppm, que é devido a hidrogênios de dupla ligação alifática dos ácidos graxos, e os sinais entre 3 e 1ppm, que são devidos aos grupos metileno e metila. Nesse espectro também não se observou sinais em torno de 4,3ppm relativos ao glicerol, indicando que esses componentes são ácidos graxos livres.

PA/31, CNPDIA, set/99, p.5

Na figura 3 está o espectro de RMN de ^1H do extrato em CDCl_3 . Nesta figura pode-se ver os sinais típicos de ácidos graxos insaturados, com o sinal dos hidrogênios de dupla ligação em 5,3ppm, os sinais dos hidrogênios metilênicos do C-1, entre as duas duplas ligações em 2,7ppm, característico de ácido linoléico, os sinais dos outros metilenos entre 2,2 e 1ppm e o da metila terminal em 0,9ppm. Como neste espectro também não foram observados os sinais em 4,3ppm dos hidrogênios do glicerol e um sinal largo em 6,9ppm confirmou-se que os lipídeos são ácidos graxos livres, com alto teor de ácido linoléico.

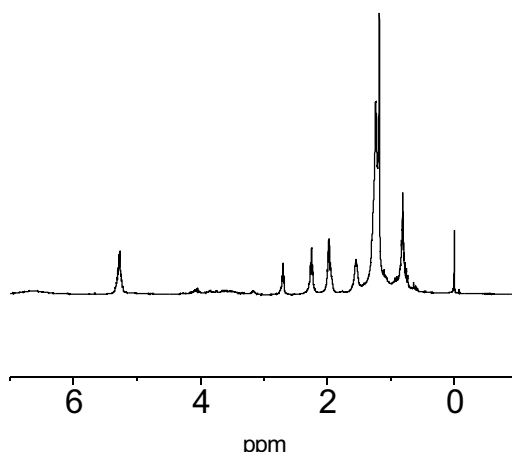


Figura 3: Espectro de RMN de ^1H dos ácidos graxos extraídos com clorofórmio dos corpos protéicos de milho com 21 dias após polinização. O solvente utilizado na análise foi CDCl_3 .

Com os espectros de ^{13}C em CDCl_3 dos extratos também observou-se espectros típicos de ácidos graxos livres, ricos em ácido linoléico, com sinais entre 128 e 130ppm, e com ausência dos sinais em 62 e 69ppm do glicerol dos triglicerídeos. Os sinais das carbonilas estão em 180ppm, típico de ácido graxo livre. O sinal da carbonila de triglicerídeos ocorre em torno de 173ppm.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa confirmaram a presença de ácidos graxos livres. Com essa análise, e com os espectros de RMN de ^{13}C , determinou-se que os ácidos graxos presentes nos corpos protéicos são os ácidos mirístico, palmítico, oléico e linoléico, nas proporções de 1, 21, 19 e 59 %, que é uma composição bem similar às observadas para os triglicerídeos do óleo de milho.

Com esses resultados demonstrou-se pela primeira vez que os ácidos graxos livres estão presentes dentro dos corpos protéicos, o que certamente é uma informação que contribuirá para o entendimento de como as zeínas são depositadas nos corpos protéicos e sobre suas estruturas tridimensionais.

Agradecimentos

O projeto foi financiado pela FAPESP, processo número 97/13449-1 e CNPq. Lucimara Aparecida Forato é bolsista de doutorado pela agência CAPES.

Ao Professor Dr. Fernando Mauro Lanças, IQSC-USP, São Carlos, pelas análises cromatográficas.

PA/31, CNPDIA, set/99, p.6

Referências

1. LASZTITY, R. **The chemistry of cereal proteins**, New York CRC press, 1996.
2. SHEWRY, P.R.; MILES, M.J.; TATHAM, A.S. The prolamin storage proteins of Wheat and related cereals. **Biochemistry Journal**. v.267, p.1-12, 1990.
3. LENDING, C.R.; LARKINS, B.A. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. **The Plant Cell**. v.1, p.1011-1023, 1989.
4. LARKINS, B.A., LENDING, C.R., WALLACE, J.C. Modification of Maize-Seed-Protein quality. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.58, n.2, p.S264-S269, 1993
5. ALVAREZ, I., GELI, M.I., PIMENTEL, E., LUDEVID, D., TORRENT, M. Lysine-rich gamma-zeins are secreted in transgenic Arabidopsis plants. **Planta**. v.205, n.3, p.407-427, 1998.
6. TATHAM, A.S., SHEWRY, P.R., BELTON, P.S., IN: Y. POMERANZ (ED.), **Adv. Cereal Tech. X**, Am. Assoc. Cer. Chem, St. Paul, MN, 1990, p.1-78 (1990).
7. SAINANI, M.N., MISHRA, V.K., GUPTA, V.S., RANJEKAR, P.K. (1992) Circular dichroism and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy of pennisetin from pearl millet. **Plant Science**. 83, p.15-22.
8. RUTAR, V. Magic Angle Sample Spinning NMR Spectroscopy of Liquids as a Nondestructive Method for Studies of Plant Seeds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.37, p.67-70, 1989.
9. COLNAGO, L.A., SEIDL, P.R., Application of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance to the Germination of Soybean Seeds in Vivo. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 31, p. 459-461, 1983